

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Oktober 2005 (06.10.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/092922 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/705 (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2005/000455
- (22) Internationales Anmeldedatum:
10. März 2005 (10.03.2005)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2004 015 179.2 25. März 2004 (25.03.2004) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): ONCOMAB GMBH [DE/DE]; Friedrich-Bergius-Ring 15, 97076 Würzburg (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VOLLMERS, Heinz [DE/DE]; Budapesterstrasse 23, 97084 Würzburg (DE). HENSEL, Frank [DE/DE]; Am Exerzierplatz 1, 97070 Würzburg (DE).
- (74) Anwalt: PÖHNER, Wilfried; Röntgenring 4, Postfach 63 23, 97013 Würzburg (DE).

- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ANTIGEN OF THE PM-2 ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: ANTIGEN DES PM-2 ANTIKÖRPERS UND DESSEN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a polypeptide, which is expressed on the cell surface as a membrane-bound protein, is glycolyzed at one or more points (membrane glycoprotein) and whose amino acid sequence corresponds partially or completely to that of the integrin binding protein p80 (accession # AJ131720) or REV1 (accession # AF206019). The membrane glycoprotein is expressed by neoplastic cells and not by non-neoplastic cells and as an antigen specifically binds the human monoclonal antibody PM-2 (DSM number: DSM ACC2600) and is in addition N-glycosidically and O-glucosidically linked. The invention also relates to a method for the isolation or production of the antigen and to the use of the latter for producing a medicament for immunization. The isolated antigen is also used to identify medicaments with an apoptotic or cell-proliferation inhibiting action. The invention also relates to the use of the membrane glycoprotein as a tumour marker.

(57) Zusammenfassung: Polypeptid, das als membranständiges Protein an der Zelloberfläche exprimiert wird, das an einer oder mehreren Stellen glykosiliert ist (Membranglykoprotein) und dessen Aminosäuresequenz teilweise oder ganz der des Integrin-Bindungsproteins p80 (accession # AJ131720) oder REV1 (accession # AF206019) entspricht, wobei das Membranglykoprotein von neoplastischen Zellen und nicht von nicht-neoplastischen Zellen exprimiert wird, und als Antigen den humanen monoklonalen Antikörper PM-2 (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) spezifisch bindet, sowie N-glykosidisch und O-glykosidisch glykosiliert ist. Die Erfindung lehrt außerdem ein Verfahren zur Isolation/Herstellung des Antigens und dessen Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung. Das isolierte Antigen dient auch zur Identifikation von Arzneimitteln mit apoptotischer oder zellproliferationsinhibierender Wirkung und darüberhinaus der Verwendung des Glykomenproteins als Tumormarker.

WO 2005/092922 A2

ANTIGEN DES PM-2 ANTIKÖRPERS UND DESSEN VERWEN- DUNG

Die Erfindung betrifft ein Polypeptid, das als membranständiges Protein an der Zelloberfläche exprimiert wird, das an einer oder mehreren Stellen glykosiliert ist (Membranglykoprotein) und dessen Aminosäuresequenz teilweise oder ganz der des Integrin-Bindungsproteins p80 (accession # AJ131720) oder REV1 (accession # AF206019) entspricht.

10

Des Weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids in der Tumorbehandlung, Tumordiagnose und in der Tumorforschung.

15

Hintergrund der Erfindung

Trotz der Fortschritte der Chemotherapie bleibt die erfolgreiche Krebsbehandlung gegenwärtig eine der größten Herausforderungen in der Medizin. Bei diesem Ziel spielt insbesondere die frühe Diagnose von Krebs eine große Rolle. Eine alarmierende hohe Zahl der Krebspatienten befindet sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits in einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit. Neben dem frühzeitigen Nachweis von Tumorzellen im Gewebe spielt natürlich auch die Suche nach neuen Mitteln zur Krebsbekämpfung eine große Rolle, z.B. durch Inhibition der Zellproliferation oder durch Einleitung der Apoptose. Apoptotische Rezeptoren an der Zelloberfläche, wie jene der NGF/TNF-Familie werden prädominant auf Lymphozyten exprimiert, befinden sich aber auch auf verschiedenen anderen Zelltypen, weshalb sie sich nachteiligerweise nicht für eine Krebstherapie eignen.

nen. Insbesondere haben bei *in-vivo*-Tests Liganden und Antikörper für diese Rezeptoren zu Leberschäden geführt.

Tumorspezifische Rezeptoren (Antigene) mit apoptotischer Funktion, die an der Zelloberfläche neoplastischer Zellen exprimiert werden,

5 sind daher für die Krebstherapie besonders wichtig. Das gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass zunehmend die Identifizierung und Isolation humaner monoklonaler Antikörper mit apoptotischer Wirkung gelingt. Durch Einsatz der Hybridomtechnologie ist die Iso-

10 lierung einer Serie tumorspezifischer IgM Antikörper aus dem Gewebe von Krebspatienten sowie aus dem Gewebe gesunder Spender gelungen. Insbesondere konnten bereits zwei humane monoklonale tumorspezifische Antikörper und deren Antigene identifiziert werden.

So bindet der humane monoklonale Antikörper SC-1 spezifisch am CD-55 Rezeptor (Cancer Research, 1999 Oct. 15, 59 (20), 5299-
15 5306, Hensel et. al) während der humane monoklonale PAM-1 Antikörper spezifisch am CFR-1 Rezeptor bindet (Oncol. Rep. 2004, Apr. 11 (4), 777-784, Brändlein et. al). Humanen monoklonalen Antikörpern dieser Art wird für die Behandlung und Diagnose von Krebs eine große Rolle zugeschrieben. Ihre Bedeutung für die Krebstherapie

20 liegt in der Induktion von Apoptose und/oder Inhibition der Zellproliferation nach spezifischer Bindung an die entsprechenden Antigene (Rezeptoren) auf der Oberfläche neoplastischer Zellen.

Mit Hilfe des humanen monoklonalen Antikörpers PM-2 (DE 102 305
25 156 A1) (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) gelang nun die Identifikation des erfindungsgemäßen Glykomenbranproteins, das als Antigen (Rezeptor) den PM-2 Antikörper spezifisch findet. Ein Sequenzvergleich im Rahmen der massenspektroskopischen Analyse (siehe Figur 6) des erfindungsgemäßen Antigens offenbarte die zu-
30 mindest im untersuchten Bereich vorliegende Homologie zwischen

dem erfindungsgemäßen Antigen und einem aus dem Stand der Technik bekannten Protein (NCBI accession # AJ131720), das als p-80 Protein bezeichnet wird bzw. REV1 (accession # AF206019)

5

Definitionen

Apoptose ist der programmierte Zelltod, d. h. Selbstmord von Zellen, durch Fragmentation der DNA, Zellschrumpfung und Dilatation des endoplasmatischen Reticulums, gefolgt von Zellfragmentation und der Bildung von Membranvesikeln, den sog. apoptotischen Körpern.

10

Sie ist die häufigste Todesursache eukaryontischer Zellen und kommt vor in der Embryogenese, Metamorphose und Gewebsatrophie. Die Apoptose garantiert als die physiologische Form des Zelltods eine schnelle und saubere Entfernung unnötiger Zellen, ohne Entzündungsvorgänge oder Gewebeverletzungen auszulösen wie im Falle der Nekrose. Unter pathologischen Bedingungen dient die Apoptose auch zum Entfernen maligner Zellen, wie etwa Krebsvorläuferzellen. Apoptose kann durch verschiedenste Stimuli ausgelöst werden, wie etwa durch zytotoxische T-Lymphozyten oder Zytokine, wie Tumornekrosefaktor, Glykokortikoide und Antikörper.

15

Glykosilierung

Membranglykoproteine weisen auf ihrer extrazellulären Seite Zuckerreste (Glycokalix) auf, die entweder an den Amidstickstoff einer Asparaginseitenkette gebunden sind (N-Bindung) oder an das Sauerstoffatom einer Serin- oder Threoninseitenkette (O-Bindung). Der direkt mit der Seitenkette verknüpfte Zucker ist meistens N-acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin. Kohlenhydrate können sehr vielfältige Strukturen ausbilden. Zum einen können verschiedene Monosaccharide über eine oder mehrere OH-Gruppen miteinander verknüpft sein. Zum zweiten können die am C-1-Atom

20

25

30

ansetzenden Verknüpfungen eine α - oder β -Konfiguration haben. Unter Ausnutzung dieser verschiedenen Verknüpfungen können Glykomembranproteine ausgedehnte aus Oligosacchariden aufgebaute Verzweigungen aufweisen.

5

Es ist bekannt, dass die Kohlenhydratstruktur (Glykosilierungsmuster, Glykokalix) auf der Zelloberfläche Informationscharakter hat für die interzelluläre Erkennung. So benötigt z.B. das Immunsystem das Glykosilierungsmuster zur Erkennung und Adsorption an die Zielzelle, wobei die strukturellen Grundlagen für den Ablauf dieses Vorgangs noch nicht verstanden sind.

Integrine sind an die Oberfläche von Zellen gekoppelte Proteine, deren lipphiler Teil die Zellwand durchspannt (Transmembranproteine) und deren extrazelluläre Komponenten glykosiliert sind (Glykomembranproteine). Durch einen als Adhäsion bezeichneten Vorgang vermitteln Integrine die Bindung von Zellen an die extrazelluläre Matrix und an andere Zellen. Für die Selektivität der Bindung ist neben der Aminosäuresequenz der Integrine und der dreidimensionaler Proteinstruktur die Struktur der an die Integrine gebundenen Zucker verantwortlich. Integrine sind Heterodimere, die aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammengesetzt sind, wobei es etwa 10 unterschiedliche α -Untereinheiten und mindestens doppelt so viele unterschiedliche β -Untereinheiten gibt. Die daraus alleine für den Rezeptortyp der Integrine erwachsende Variabilität erklärt, dass die der Zelladhäsion unterliegenden allgemeinen Mechanismen noch bei weitem nicht vollständig verstanden sind. Die Spezifität der Integrin-Bindung wird außerdem durch die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration moduliert. Es ist bekannt, dass Integrine bevorzugt an die Arg-Gly-

Asp-Sequenz (Ruoslahti, Pierschbacher, Science, 1987, 238, 491) der extrazellulären Matrix binden.

Unter den Adhäsionsrezeptoren wirken Integrine insbesondere bei
5 der Signaltransduktion, d.h. bei der Informationsübermittlung extra-
zellulärer Signale in das Innere der Zelle und aus dem Inneren der
Zelle nach außen. Durch Adhäsion und nachfolgender Signalüber-
tragung in das Zellinnere werden intrazelluläre Prozesse in Gang
gesetzt, die zur Umstrukturierung des Cytoskeletts und zur Induktion
10 von Signalkaskaden führen können. Integrin-Bindungsproteine sind
die Bindungspartner der Integrine bei der Adhäsion.

Zelladhäsionsvorgänge wirken regulatorisch auf das Expressions-
muster und damit auf die Spezifität der Rezeptoren selbst. Zell-
15 Adhäsionsmechanismen sind daher wichtig für das Zellwachstum,
die Zellmigration und die Differenzierung, insbesondere sind sie be-
teiligt, wenn Zellen ihre spezialisierten Formen verlieren und zu me-
tastasierenden Krebszellen werden.

20

Neoplastische Zellen

Als Neoplasma oder Tumore wird eine abnorme Gewebsmasse be-
zeichnet, deren Wachstum autonom (unabhängig von Wachstums-
faktoren), unkoordiniert, ziellos und progressiv ist. Dabei bestehen
25 Tumore aus zwei Komponenten. Zum einen den Parenchymzellen,
die auch als neoplastische Zellen bezeichnet werden und dem nicht-
tumorösen Stroma, d.h. dem Bindegewebe und den Blutgefäßen.
Als neoplastische Zelle wird im Zusammenhang mit dem erfindungs-
gemäßen Antigen eine Zelle bezeichnet, die einer unkontrollierten
30 Zellteilung unterliegt oder eine Zelle die keinen Apoptosemechanis-

mus aufweist. Eine neoplastische Zelle im Sinne der Erfindung kann auch beide Störungen aufweisen und kann sich auch dadurch auszeichnen, dass ihr Zell-Zyklus vom normalen Zell-Zyklus abweicht.

5

Beschreibung

- Die aus dem Stand der Technik (Wixler et al., FEBS Letters 1999, 445, 351-355) bekannte Sequenz (accession # AJ131720) codiert für das α -Integrin- Bindungsproteins p80 das mit der proximalen Region des α - Integrins interagiert. Diese Bindungseigenschaften legen nahe, dass es sich bei p-80 um ein membranständiges Protein handeln muss. Angaben zur Glykosierung des p-80 Proteins sind nicht bekannt.
- 10 Das ebenfalls aus dem Stand der Technik bekannte humane REV-1 Protein (accession # AF206019) weist ebenfalls zumindest abschnittsweise Sequenzhomologie zum erfindungsgemäßen Antigen aufweist. Als Funktion von REV1 wird eine Deoxycytidyl-Transferase Aktivität angegeben. Die Deoxycytidyl-Transferase katalysiert vermutlich die Anbindung von Desoxycytidylat an den Tochter-DNA-Strang während der DNA-Replikation im Zellkern. REV1 ist also im Gegensatz zum Integrin bindenden Protein p-80 kein membranständiges Protein und ist im Kern lokalisiert.
- 15 20 25 Die Tatsache, dass Polypeptide mit gleicher Aminosäursequenz zum einen als membranständige Proteine und zum anderen als Proteine im Zellkern vorliegen können, zeigt, dass die posttranskriptionale Modifikationen, wie beispielsweise die Glykosierung, eine große Rolle im Hinblick auf die Lokalisation und die Funktion eines Polypeptids spielen.

len müssen und man trotz Sequenzhomologie nicht von einer Identität solcher Proteine ausgehen kann.

5 Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Identifikation und Charakterisierung eines Antigens an das der tumorspezifische humane monoklonale Antikörper PM-2 bindet (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600), sowie in der Verwendung des Antigens zur Tumorbehandlung und Tumordiagnose.

10 Der PM-2 Antikörper (DE 102 30 516 A1) ist ein humaner monoklonaler Antikörper mit schweren und leichten Kettenmolekülen, die jeweils einen von Antikörper zu Antikörper konstant und einen von Antikörper zu Antikörper variabel aufgebauten Bereich aufweisen oder eine funktionelles Fragment davon, wobei wenigstens eine der variablen Regionen der leichten Kette substanziell jeweils die in SEQ NO. 4 und/oder die der schweren Kette in SEQ ID NO. 3 des Sequenzprotokolls aufweist. Der PM-2 Antikörper wurde mit Hilfe der Hybridom -Technik hergestellt, wobei die Hybridom-Zellen (DSM ACC2600) durch Fusion der Hetero-Myelom-Zellen HAB-1 sowie deren Subklone mit P-Lymphozyten gewonnen wurde. Die P-Lymphozyten wurden aus einem lymphatischen Organ vorzugsweise, der Milz oder Lymphknoten eines Karzinom-Patienten entnommen. Der humane monoklonale Antikörper PM-2 zeichnet sich dadurch aus, dass er nach spezifischer Bindung an das entsprechende PM-2 Antigen auf der Oberfläche einer neoplastischen Zelle in dieser Zelle Apoptose einleitet und/oder die Zellproliferation inhibiert. Die Apoptotische Wirkung des PM-2 Anikörpers wurde mit Hilfe eines Cell-Death-ELISA Experiments nachgewiesen und ist in Dokument DE 102 30 516 A1 ausführlich beschreiben.

15

20

25

Zur Lösung der Aufgabe lehrt die Erfindung ein Glykomenbranprotein mit Antigeneigenschaften, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es

- 5 - von neoplastischen Zellen und nicht von nicht-neoplastischen Zellen exprimiert wird, und
- als Antigen den humanen monokonalen Antikörper PM-2 (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) spezifisch bindet, sowie
- 10 - N-glykosidisch und O-glykosidisch glykosiliert ist.

Das erfindungsgemäße Antigen ist tumorspezifisch, d.h. es wird nur von neoplastischen Zellen exprimiert. Für die spezifische Bindung des humanen monokonalen Antikörper PM-2 (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) am erfindungsgemäßen Antigen ist die Glykosilierung verantwortlich, die N-glykosidisch und O-glykosidisch ist.

Sowohl beim erfindungsgemäßen Antigen als auch beim zumindest abschnittsweise sequenzgleichen p-80 Protein handelt es sich um membranständige Proteine. Möglicherweise liefert die Tatsache, dass das p-80 Protein Integrin bindet einen Hinweis auf die Rolle, die das erfindungsgemäße Antigen bei der Tumorentstehung spielt. Als Zelladhäsionsmoleküle sind Integreine bei der Angiogenese wichtig. So wird das $\alpha V\beta 3$ -Integrin von den Endothelzellen jener Gefäße exprimiert, die Tumore versorgen. Es wäre denkbar, dass das erfindungsgemäße Antigen, das in den Epithelzellen der Blutgefäße nachgewiesen wurde, ebenfalls mit Integreinen wechselwirkt und seine Hemmung einer der Angiogenesehemmung ähnliche Wirkung hat. Bekannt ist auch, dass Integreine bei der Metastasierung von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen, indem sie die Adhäsion der über

die Blutbahnen transportierten Tumorzellen in bislang tumorfreies Gewebe überhaupt erst ermöglichen.

5 Für die spezifische Bindung des Antikörpers PM-2 haben erfundungsgemäßen Antigen spielen vermutlich die *N*-glykosidisch gebundenen Glykostrukturen eine besondere Rolle. Die genauer Analyse der Glykosylierungsstellen mit Hilfe einer dem Fachmann bekannten Software (Software der Datenbank des „UK MRC Human Genome Mapping Project“

10 <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/prot-anal.html>) ermittelt.

Ausgehend von der nur partiell vorliegenden Sequenz (774 Aminosäuren) von p-80 ergab diese Analyse, dass die *N*-Glykosilierung insbesondere an den Aminosäurepositionen 333, 343, 450 und 568 erfolgt. Eine entsprechende Analyse mit der komplett vorliegenden Sequenz der REV1 Proteins ergab, dass bei REV1 insbesondere an den Aminosäurepositionen 810, 830, 927 und 1045 *N*-Glykosilierung vorliegt.

20 Die Anzahl der mit Hilfe des gleichen Verfahrens ermittelten O-Glykosilierungsstellen liegt bedeutend höher.

25 Es liegt im Rahmen der Erfindung, dass das mit Hilfe des humanen monoklonalen Antikörpers identifizierte Antigen aus einem monomer oder aus mehreren gleichen Untereinheiten aufgebaut ist. Die Möglichkeit, dass es sich um ein Homomer aus zwei gleichen Untereinheiten (Dimer) handelt oder mit anderen Proteinen assoziiert ist, könnte auch erklären, dass das mittels Immuno-Blot (Western-Plot) angebare Molekulargewicht bislang in einer weiten Bandbreite variiert.

- Die das Protein exprimierenden Zellen wurden bereits im Zusammenhang mit der Charakterisierung der PM-2 Antikörpers genannt. Daher wird hier auf das Dokument DE 102 305 156 A1 verwiesen.
- 5 Die Hybridomzelllinie, die den Antikörper PM-2 produziert, ist nach dem Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patenthinterlegungen am 02.07.2003 unter der Eingangnummer DSM2600 beim DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig), hinterlegt worden. Für die Charakterisierung des erfindungsgemäßen Antigens wurde insbesondere Pankreas-Karzinomzellen der Zelllinie BXPC3 (ATCC-Nummer CRL1687) verwendet, weil auf deren Oberfläche das Antigen besonders gut exprimiert wird.
- 10
- 15 Für die Erklärung der immunbiologischen Bedeutung des erfindungsgemäßen Antigens könnte entscheiden sein, dass das Antigen auf der Oberfläche von Epithelzellen im Tumorgewebe exprimiert wird.
- 20 Von entscheidender Bedeutung ist das therapeutische Potenzial des erfindungsgemäßen Antigens, das darin besteht, dass nach Bindung des PM-2 Antikörpers an das Antigen in einer neoplastischen Zelle Apoptose induziert wird. Alternativ ist denkbar, dass aufgrund der spezifischen Bindung des PM-2 Antikörpers an das Antigen auf der Oberfläche neoplastischer Zellen deren Zellproliferation inhibiert. Beide Wirkmechanismen sind für die Tumortherapie interessant.
- 25
- 30 Im Rahmen der Erfindung wurde ein Verfahren zur Isolation des erfindungsgemäßen Antigens entwickelt. Nach Homogenisierung und Solubilisierung in einem dem Fachmann bekannten Detergenz wird

das Antigen chromatographisch aufgereinigt. Dabei kommt insbesondere die Größen-Ausschluss-Chromatographie (Size-exclusion) zum Einsatz. In einer Verbesserung des Isolationsverfahrens ist denkbar, dass sich an die Größen-Ausschluss-Chromatographie ein weitere Schritt in Form einer Anionen-Austausch-Chromatographie anschließt. Durch diesen zweiten Aufreinigungsschritt wird die Reinheit des isolierten Glykomenbranproteins verbessert.

Das derart isolierte Antigen kann zur Herstellung eines Arzneimittels unter Verwendung der üblichen pharmazeutischen Hilfs- und Trägerstoff verwendet werden. Im einfachsten Fall ist die *in-vivo* Verabreichung des aufgereinigten Antigens in einer physiologischen NaCl-Lösung vorgesehen.

Es liegt jedoch ebenso im Rahmen der Erfindung, dass das aufge-
reinigte Glykomenbranprotein als Antigen eingesetzt wird, um spezi-
fisch bindende Liganden oder Adhäsionspeptide zu identifizieren.
Prinzipiell ist denkbar, dass die auf diese Weise identifizierten Poly-
peptide nur abschnittsweise der Sequenz des humanen monoklo-
nen Antkörpers PM-2 entsprechen, aber dennoch in neoplastischen
Zellen Apoptose einleiten und/oder in diesen Zellen die Zellprolifera-
tion inhibieren. Zur Verstärkung dieser Wirkung können die Adhäsion-
speptide oder Liganden mit einem Radionuklid, einem Cytoto-
kin, einem Cytokin oder einem Wachstuminhibitor gekoppelt sein.

Es denkbar, dass das erfindungsgemäße Glykomenbranprotein als
Antigen bei der Identifikation von Wirkstoffen im Rahmen eines
Hoch-Durchsatz-Screenings eingesetzt wird. Derartige Verfahren
und deren Ausgestaltungen sind dem in der pharmazeutischen For-
schung tätigen Fachmann bekannt.

Im Rahmen der Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Antigens als Tumormarker vorgesehen. Dabei ist der Nachweis des erfindungsgemäßen Membranglykoproteins auf der Oberfläche neoplastischer Zellen mit Hilfe des PM-2 Antikörpers durchführbar. Mit Hilfe des in den Sequenzprotokollen 1 und 2 angegebenen Vektorinserts gelang u.a. in einem Antisense Experiment der Nachweis, dass das erfindungsgemäße Membranglykoprotein das Antigen für den spezifisch bindenden humanen monoklonalen Antikörper PM-2 ist.

5

10

Beispiel 1
Material und Methoden

5 **Zellkultur**

Zur Gewinnung des Rezeptors wurde die Karzinomzelllinie BXPC-3 (ATCC-Nummer CRL1687) verwendet. Für vergleichende Untersuchungen, z.B. Western-Blot-Analyse wurde außerdem die bekannte Magenadenokarzinom-Zelllinie 23132/87 (DSMZ Eingangsnummer DSM201) (Hensel et al. 1999, Int.J.Cancer 81:229-235) eingesetzt.
10 Die Zellen wurden bis zu 80% Konfluenz in RPMI-1640 (PAA, Wien Österreich) ergänzt mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin (1% für beide) gezüchtet. Für die beschriebenen Untersuchungen wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA getrennt und zweifach mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen.
15

Präparation von Membranauszügen

Die Isolierung der Membranproteine aus Tumorzellen wurde in der Weise, wie sie durch Hensel et al. (Hensel et al., 1999, Int.J.Cancer 81:229-235) beschrieben wurde, unter Benutzung der Zelllinie BXPC-3 durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurden die zusammenhängenden Tumorzellen zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgelöst und zentrifugiert, und in einem hypotonischen Puffer (20 mM HEPES, 3 mM KCl, 3mM MgCl₂) aufgelöst.
20 Nach einer 15 Min. Inkubationszeit auf Eis und einer Ultraschallbehandlung für 5 Min., wurden die Kerne durch Zentrifugieren bei 10.000 g für eine Dauer von 10 Min. pelletiert. Der Überstand wurde für 30 Min. bei 100.000 g in einem Swing-out-Rotor zentrifugiert und hierdurch die Membran pelletiert. Nachdem die Pellets mit dem hypotonischen Puffer gewaschen wurde, wurden sie in einen Membran
25
30

Lysis Puffer (50 mM HEPES pH 7.4, 0,1 mM EDTA, 10% Glycerol, und 1% Triton X-100) erneut aufgelöst. Ein Protease Inhibitor (Boehringer, Mannheim, Deutschland) wurde allen Lösungen zugeben.

5

Reinigung des Antigens

Die Reinigung des Antigens wurde mit Säulenchromatographie unter Verwendung einer Pharmazia (Freiburg, Deutschland) FPLC Einheit durchgeführt. Für die Größenausschluß (Size-Exclusion)- Chromatographie wurde eine Pharmazia Superdex 200 (XK 16/60)

10

Säule mit 5 mg des Membranpräparates geladen und mit einem Puffer A betrieben (100 mM Tris/Cl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 40mM NaCl, 1% Triton X-100). Dann wurde das Eluat fraktioniert und durch Western-Blot Analyse auf Reaktionen mit dem Antikörpern PM-2 untersucht. Die positiven Fraktionen wurden auf einer MonoQ (5/5 Säule)

15

unter Verwendung des Puffers A gegeben. Die gebundenen Proteine wurden mit Hilfe eines linearen Gradienten unter Verwendung des Puffers B (100 mM Tris/ Cl, pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% Triton X-100) ausgewaschen, fraktioniert und mit Coomas-siegefärbtem SDS-PAGE und Western-Blot Analyse untersucht.

20

Western blotting

Die Auftrennung durch 10 %ige SDS-PAGE Gele und Western blotting der Proteine wurden unter Standardbedienungen, wie anderweitig beschrieben (Hensel et al., 1999, Int.J.Cancer 81:229-235),

25

durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurden die geblotteten Nitrozellulose -Membrane mit PBS blockiert, welches 2 % Magermilchpulver enthielt, dem eine einstündigen Inkubation mit 10 µg/ml gereinigtem Antikörper 103/51 folgte. Nach dreimaligem Waschen mit PBS + 0,05% Tween-20 wurde der zweite Antikörper (Peroxidase gekoppelte Hasen antihumane IgM Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutsch-

30

land)) inkubiert. Die Reaktion wurde mit Hilfe des Supersignal Chemilumineszenz kits von Pierce (KMF, St. Augustin, Deutschland) nachgewiesen.

5 Die mit Hilfe von Western-Blots auf einem entsprechenden SDC-Gel identifizierten positiven Banden wurden aus dem Gel getrennt und zur MALDI-Analyse genutzt.

MALDI Peptide-Analyse

10 Die aus dem SDS-Gel getrennten Proteinbanden wurden in kleine Stücke von etwa 1mm x 1mm zerschnitten. Die Gelstücke wurden gewaschen, mit DTT reduziert, S-Alkyliert mit Iodoacetamid und Trypsin behandelt (unmodifiziert, Sequenzgrad, Boehringer) wie anderweitig beschrieben (Shevchenko et al., 1996b Anal.Chem.

15 68:850-858). Nach 3 Stunden der Verdauung bei 37°C wurden 0.3 µl der Lösung entfernt und einer massenspektroskopischen Analyse (MALIDI) mit Hilfe eines Bruker Reflex MALDI-TOF unterzogen, welches mit einer nachträglichen Extraktion (Bruker, Franzen, Bremen, Deutschland) ausgerüstet war. Die Dünnfilmtechnik wurde zur Pro-

20 benpräparierung angewendet (Jensen et al., 1996 Rapid.Commun. Mass.Spectrom 10:1371-1378). Die tryptischen Peptid-Massen wurden dazu verwendet, um nicht redundante Proteinsequenzdaten durch ein Peptid-Suchprogramm, das im Hause entwickelt wurde, zu suchen.

25

Klonierung des p80-Antisense-Vektor und Transfektion

RNA Isolierung, cDNA Synthese und PCR wurden wie beschrieben (Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235) durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurde für die Amplifikation eines Fragments mittels

30

PCR aus einem Bereich von Position 181 bis Position 681 der

Nukleotid Sequenz von p-80 (accession # AJ131720) folgende Primer benutzt:

5 P80-Rev 3' 5' CTGTTCCATACGATTTCATGC 3'
 P80-Rev 5' 5' TCGAACTGGTCTATCATCCAA 3'

Die Amplifikation wurde mit folgendem Zyklusprofil durchgeführt:
95°C, 2 Min; nachfolgend 35 Zyklen bei 94°C, 30 sec; 60°C, 30 sec;
72°C 60 sec. und abschließend 72 °C, 4 min. Die Klonierung in den
10 pCR- Skript Amp SK (+) Vektor und das Sequenzieren der DNA wur-
de wie früher schon beschrieben (Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer
81:229-235) durchgeführt.

Das Insert wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem
pCR- Skript Amp SK (+) Vektor ausgeschnitten und in den pHook-2
15 Vektor (Invitrogen, Leek, Niederlande) subkloniert. Verschiedene
Klone wurden durch Sequenzierung auf die erfolgreiche Klonierung
untersucht. Es wurde ein Klon gewählt, bei dem die codierende Se-
quenz in Antisense-Richtung zum Promotor kloniert worden ist. Die-
se Klon wurde amplifiziert und Vektoren für die Antisense-
20 transfektion isoliert.

Die Transfektion der Zelllinie BXPC-3 mit pHook2-anti PM-2-R wurde
mit einem Primefaktor Reagenz (PQLab, Erlangen, Germany) ent-
sprechend dem Lieferantenhandbuch vervollständigt. Dafür wurde
25 die Plasmid DNA auf 10 µg/ml verdünnt und das Primefaktorreagenz
im Verhältnis 1:10 einem serumfreien Wachstumsmedium beigege-
ben. Die verdünnte Plasmid DNA (450 µl), das verdünnte Primefak-
torreagenz ergänzend (90 µl) und das serumfreie Wachstumsmedi-
um (460 µl) wurden vermischt und bei Raumtemperatur inkubiert. 60
30 ml Zellkulturschalen (70% konfluent) wurden zweimal mit dem se-

rumfreien Wachstumsmedium gewaschen und anschließend die Primefaktor/DNA-Mischung tropfenweise hinzugegeben. Die Zellen wurden inkubiert für 18 Stunden bei 37°C and 7% CO₂, anschließend wurde das serumfreie Wachstumsmedium ersetzt durch ein Wachstumsmedium mit 10% FCS und die Zellen wurden weitere 24 Stunden inkubiert, bevor die Expression des Rezeptorproteins untersucht wurde.

- 5
- 10 a) Ein Teil der Zelllinie BXPC-3 wurde mit einem Kontrollvektor (p-HOOK-2), ein weiterer Teil mit den p80 Antisense-Vektor transfiziert.
b) 48 h nach der Transfektion wurden Zytospinpräparationen der Zellen angefertigt.
c) Die Zytospinpräparationen wurden mit dem PM-2 Antikörper und einem Kontrollantikörper (nur sekundärer Antikörper) angefärbt
15 d) Zellen, die mit dem p-80 Antisense-Vektor transfiziert sind, zeigen einen deutlichen Abfall in der Bindung des Antikörpers PM-2.

Verdau mit N-Glykosidase auf Zytospins

- 20 Die verwendeten Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA vom Untergrund ihrer Kulturflaschen abgelöst und anschließend zur Regeneration der Membranproteine für 1 h in RPMI-1640 Medium + 10% FCS bei 4°C inkubiert. Danach wurden mit den Zellen Zytospin-Präparate angefertigt. Die Zytospins wurden über Nacht bei RT getrocknet.
25 Nach der Trocknung wurden die Zellen für 10 min mit 100% Azeton fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit 5 mU/ml N-Glykosidase (in 100 µl Phosphatpuffer, pH 7,0) für 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank verdaut. Danach wurden die Zytospin-Präparate dreimal mit PBS gewaschen und sofort der immunhistochemischen Färbung mit den verschiedenen Antikör-
30

pern zugeführt. Als Negativkontrolle dienten Zytospins, die nur mit Phosphatpuffer inkubiert wurden, bzw. Zytospins, welche ohne Glykosidase-Behandlung einer normalen immun-histochemischen Färbung unterzogen wurden. Die Färbung erfolgte wie beschrieben. Die fertige Färbung wurde abschließend mikroskopisch ausgewertet und die Ergebnisse mit einer Photoanlage und einem Olympus Mikroskop dokumentiert.

Verdau mit O-Glykosidase auf Zytospins

10 Auch hier wurden die Zellen abtrypsinisiert und für 1 h in Kulturmedium auf Eis rekonstituiert. Nach Präparation der Zytospin-Präparate und anschließender Fixierung wurden die Zellen mit 20 µU/ml O-Glykosidase (in 100 µl Phosphatpuffer, pH 6,8) bei 37°C für 3 h inkubiert. Als Kontrolle wurden Zytospins nur mit Phosphatpuffer inkubiert oder ohne Inkubation normal gefärbt. Die immunhistochemische Färbung erfolgte wie beschrieben.

**Immunohistochemisches Färben von
lebenden Zellen und Azeton-fixierten Zellen**

20 Für das Färben lebender Zellen wurden die Zellen herausgelöst, gewaschen und verdünnt auf 1×10^6 Zellen pro ml. 1 ml der Zelllösung werden bei 1.500 g für 5 Min. zentrifugiert. Der auf 40 µg/ml mit vollständigen RPMI verdünnte Antikörper wird zu einem Endvolumen von 1ml ergänzt und für 90 Min. auf Eis inkubiert. Dann werden die Zellen bei 1.500 g für 5 Min. pelletiert und wieder aufgelöst mit 500 µl RPMI. Mit 200 µl der Zelllösung werden die Zytospinpräparate präpariert und für 30 Min luftgetrocknet. Die Zellen werden in Aceton für 30 Min. fixiert und dreimal mit Tris/NaCl gewaschen. Die HRP-gekoppelten Hasen antihumanen IgM (DAKO) werden 1:50 in

PBS/BSA (01,%) verdünnt und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wird das Färben, wie oben erwähnt, durchgeführt.

- 5 Für das Färben der azeton-fixierten Zellen werden die Zytospins präpariert, bei Raumtemperatur luftgetrocknet und, wie oben beschrieben, in Azeton fixiert. Dann werden die Zytospins für 15 Min. mit PBS/BSA (0,1%) blockiert und für 30 Min. mit 10 µg/ml primärer Antikörper inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern und das Färben wird, wie oben beschrieben, durchgeführt.
- 10

Beispiel 2

Ergebnis Glykosidase - Verdau

- 15 Figur 1 zeigt den Einfluss des Glykosidase-Verdaus auf die Antikörper-Bindung von PM-2 auf der Zelloberfläche der Pankreaskarzinomzellen BXPC-3. Die Zytospins wurden nach dem Verdau immunhistochemisch mit der Positivkontrolle CAM-Keratin (A, C, E) und mit PM-2 (B, D, F) gefärbt.

20 Die Bilder A und B in Fig. 1 zeigen die Kontrollen nach Inkubation der Zellen in Glykosidase-Puffer ohne Enzym. Die Bilder C und D zeigen die Auswirkungen der N-Glykosidase-Inkubation auf die Bindung des Antikörpers PM-2 an die Pankreaskarzinomzellen. Nach Verdau mit dem Enzym N-Glykosidase kann nicht mehr mit dem Antikörper PM-2 angefärbt werden. Das bedeutet, dass der Antikörper nicht mehr an seinen Rezeptor binden konnte, weil die für die spezifische Bindung erforderliche N-gebundene Glykostruktur beim N-Glykosidase-Verdau abgespalten wurde.

25

5

Die Bilder in Fig. 1 E und F zeigen die Auswirkungen der O-Glykosidase-Inkubation auf die Bindung des Antikörpers PM-2. Während die Positivkontrolle CAM-Keratin in Bild E keine veränderte Färbung aufweist zeigt sich nach Verdau mit dem Enzym O-Glykosidase, dass die Zellen nicht mehr mit dem Antikörper PM-2 angefärbt werden können. Das legt nahe, dass neben N-gebundenen Zuckern mindestens auch eine O-glykosidisch gebundenen Determinanten des Antigens für die spezifische Bindung des PM-2 Antikörpers verantwortlich war.

10

Beispiel 3 Ergebnis Antisense Transfektion

15

Fig. 2 zeigt den Einfluß der Antisense-Transfektion auf Färbungen mit Antikörpern PM-2 und Lebendzellfärbung (Vergrößerung 200x).

20

Die rechte Spalte von Figur 2 zeigt die mit dem PM-2 angefärbten Zellen der BXPC-3 Zelllinie. In der oberen Reihe sind nicht transfizierte Zellen abgebildet. Die mittlere Reihe zeigt die mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen. In beiden Fällen zeigen die Zellen eine deutliche PM-2 Antikörper Färbung. Diese Färbung nimmt deutlich ab nach Transfektion der Zellen mit dem Antisense-Vektor. Dies zeigt das Bild in der rechten Spalte der unteren Zeile. Dieses Experiment zeigt, dass der PM-2 Antikörper an ein Membranprotein bindet, dessen Aminosäuresequenz zur Aminosäuresequenz des P-80 Proteins zumindest abschnittsweise homolog sein muss.

25

Zusammen mit dem Ergebnis des Glucosidase-Verdaus zeigt dies, dass ein Glycomembranprotein, dessen Aminosäuresequenz zumin-

30

dest teilweise mit der des P-80 Proteins übereinstimmt, das Antigen ist, an das der PM-2 Antikörper spezifisch bindet.

Beispiel 3

5

Ergebnis Westernblot

Figur 3 zeigt den immunspezifischen Nachweis des in BXPC-3-Zellen und in 23132/87-Zellen exprimierten Antigens mit Hilfe des PM-2 Antikörpers.

10

Beispiel 4

Bestimmung der N-Glykosilierungsstellen

Die in Figur 4a und 4b sowie 5a und 5b angegebenen Glykosilierungsstellen wurden mit Hilfe der Software der Datenbank des „UK MRC Human Genome Mapping Project“

15

(<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/prot-anal.html>) ermittelt.

Beispiel 5

MALDI-Analyse des PM-2 Antigens

Figur 6 zeigt das Ergebnis der massenspektroskopischen Analyse einer aus einem SDS-Gel mit Hilfe des PM-2 Antikörpers selektierten Proteinbande. Ein Sequenzvergleich der mit Hilfe des Massenspektrometer ermittelten Peptidabschnitte Nr. 2, Nr. 3, Nr. 4 und Nr. 6 Sequenzhomologie zum p-80 Protein bzw. zum REV1 Protein aufweisen.

25

Patentansprüche

- 5 1. Polypeptid, das als membranständiges Protein an der Zelloberfläche exprimiert wird, das an einer oder mehreren Stellen glykosiert ist (Membranglykoprotein) und dessen Aminosäuresequenz teilweise oder ganz der des Integrin-Bindungsproteins p80 (accession # AJ131720) oder REV1 (accession # AF206019) entspricht, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Membranglykoprotein
 - von neoplastischen Zellen und nicht von nicht-neoplastischen Zellen exprimiert wird, und
 - als Antigen den humanen monoklonalen Antikörper PM-2 (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) spezifisch bindet, sowie
 - N-glykosidisch und O-glykosidisch glykosiert ist.
- 10 2. Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die spezifische Bindung des humanen monoklonalen Antikörpers PM-2 (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) am Membranglykoprotein durch einen oder mehrere N-glykosilierte Carbohydrat-Rest (=Zucker-Rest) vermittelt wird.
- 15 3. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens an einer der Aminosäurepositionen 333, 353, 450 und 568 der partiellen Sequenz (accession # AJ131720) des p-80 Antigens eine N-Glykosilierung vorliegt.
- 20 25
- 30

4. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens an einer der Aminosäurepositionen 810, 830, 927 und 1045 der partiellen Sequenz (accession # AF206019) des REV1 Antigens eine N-Glykosilierung vorliegt.

5

5. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Membranglykoprotein ein Monomer ist oder aus mehreren gleichen Untereinheiten aufgebaut oder mit anderen Proteinen assoziiert ist.

10

6. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Molekulargewicht des Membranglykoproteins ca. 80 bis 160 kDa beträgt.

15

7. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Membranglykoprotein von den neoplastischen Zellen

20

- des Dickdarms
- der Bauchspeicheldrüse
- der Prostata
- der Gebärmutter,
- dem Eileiter,

25

- der Nebenniere und/oder
- der Lunge, sowie vom
- Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre oder der Lunge,
- des Magenkarzinoms und
- dem duktalen Karzinom der Brust

30

und nicht von nicht-neoplastischen Zellen exprimiert wird.

8. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Membranglykoprotein auf der Oberfläche der Pankreas-Karzinomzelllinie BXPC-3 (ATCC-Nummer CRL1687) exprimiert werden.
5
9. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Membranglykoprotein insbesondere auf der Oberfläche von neoplastischen Epithelzellen exprimiert wird.
10
10. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass nach Bindung des PM-2 Antikörpers (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) am Membranglykoprotein an einer neoplastischen Zelle in dieser Zelle und nicht in nicht-neoplastischen Zellen Apoptose induziert wird.
15
11. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass nach Bindung des PM-2 Antikörpers (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) an einer neoplastischen Zelle über das Membranglykoprotein in der Zelle die Zellproliferation inhibiert wird.
20
25

12. Verfahren zur Gewinnung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Membranglykoproteins aus

- Membranextrakten der Pankreas-Karzinomzelllinie BXPC-3
 - 5 durch
 - Solubilisierung und
 - nachfolgenden Einsatz der Größenausschluss-Chromatographie
- isoliert wird.

10

13. Verfahren zur Gewinnung des Polypeptids nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass sich an die Größenausschluss-Chromatographie die Durchführung einer Anionenausstausch-Chromatographie anschließt.

15

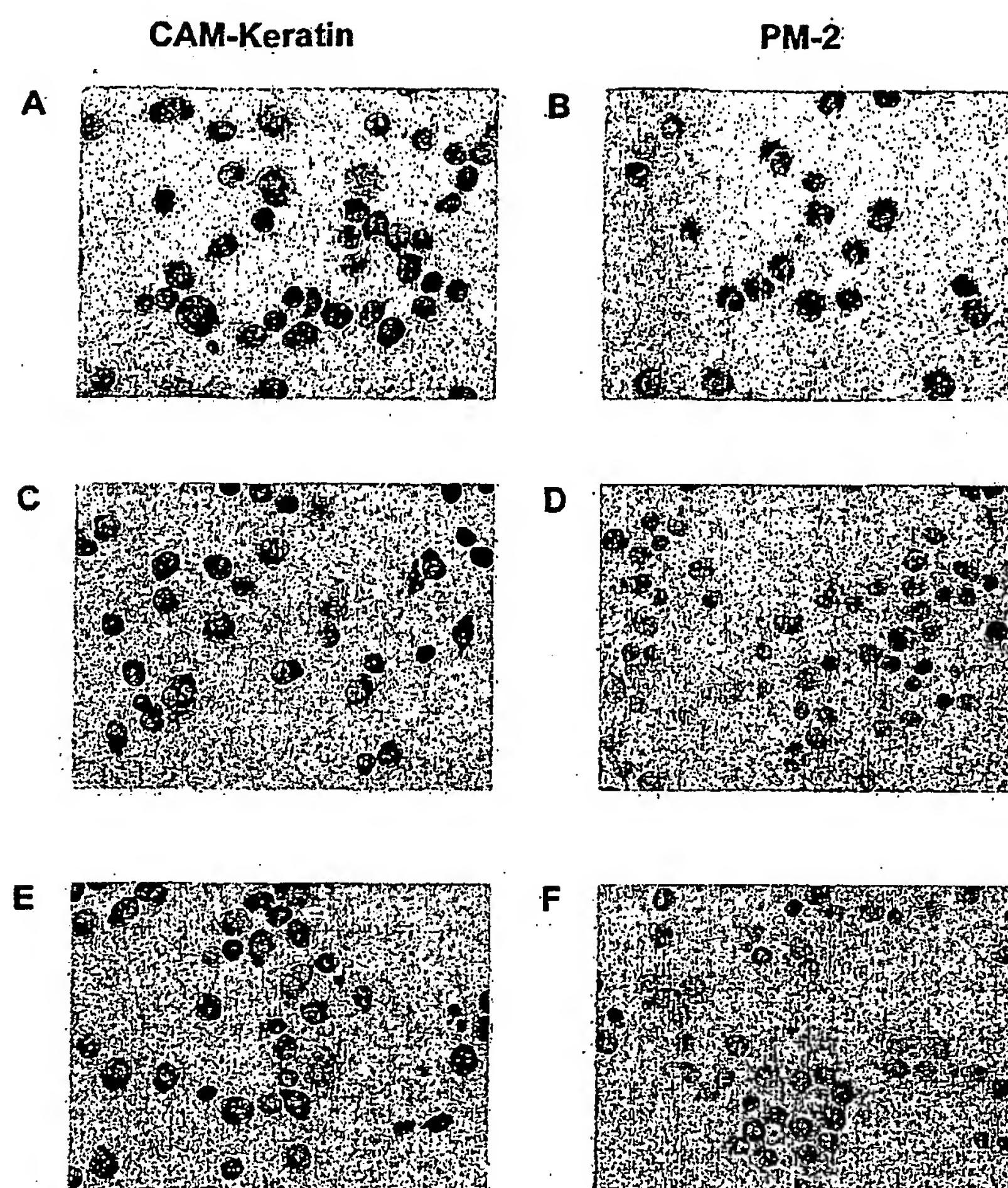
14. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels unter Verwendung der üblichen pharmazeutischen Hilfs- und Trägerstoffe, das 20 der Bekämpfung von Tumoren durch Immunisierung nach *in vivo* Verabreichung dient.

20
25

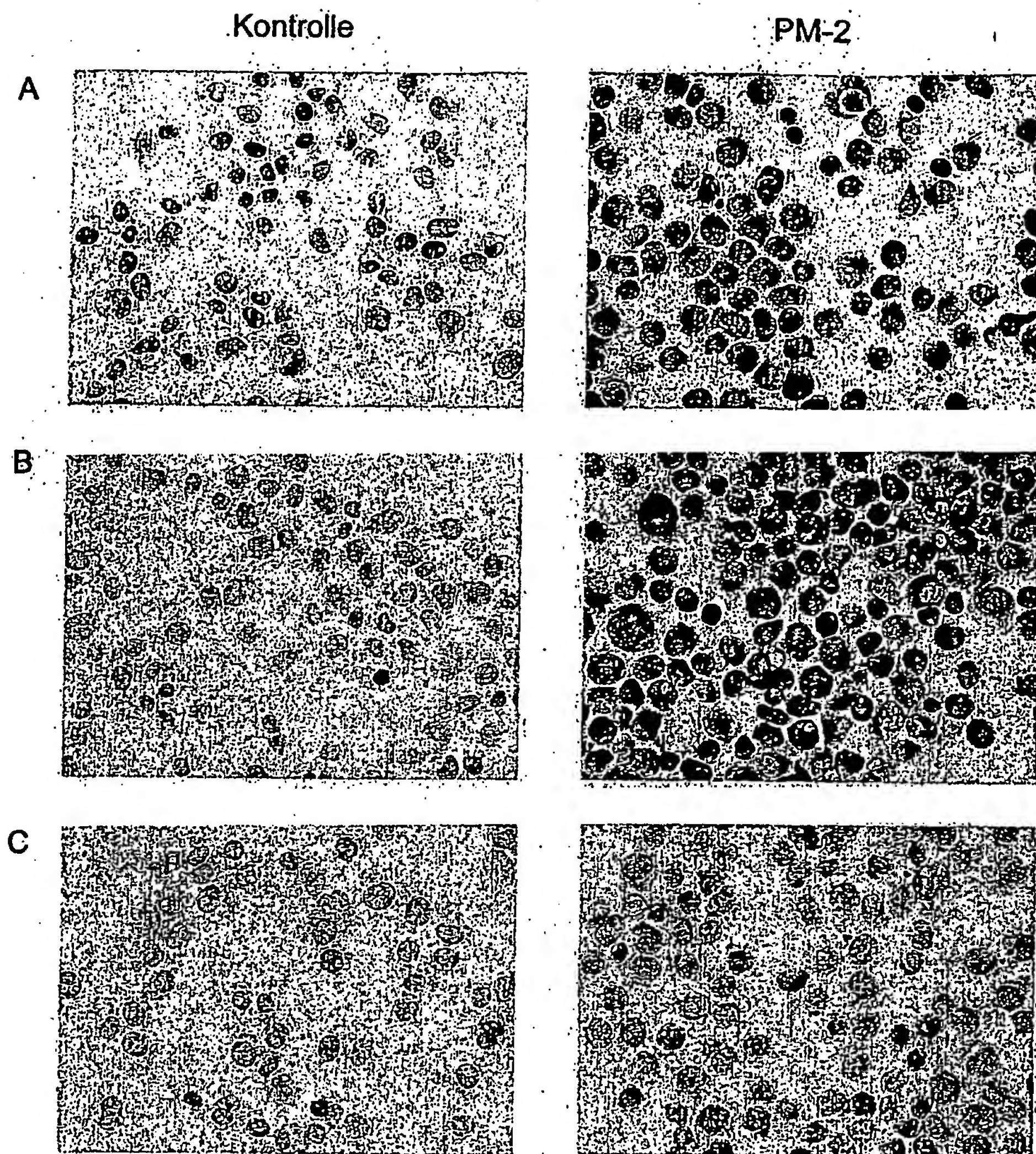
15. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Entwicklung spezifisch bindender Liganden oder Adhäsionspeptiden mit apoptotischer und/oder zellproliferation-sinhibierender Wirkung gegenüber neoplastischen Zellen.

16. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden
Ansprüche zur Entwicklung spezifisch bindender Liganden oder
Adhäsionspeptiden, wobei an den Liganden oder an das Adhäsionspeptid ein Radionukleotid, ein Fluoreszenz-Marker, ein Cytokin, ein Cytokine oder eine Wachstuminhibitor gekoppelt ist.
- 5
17. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden
Ansprüche zur Suche von Wirkstoffen in einem Hoch-Durchsatz-Screens (High-Throughput-Screening - HTS).
- 10
18. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden
Ansprüche als Tumormarker.
- 15
19. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden
Ansprüche zu Diagnosezwecken, **dadurch gekennzeichnet**,
dass über die spezifische Bindung des PM-2 Antikörpers (DSM
Eingangsnummer: DSM ACC2600) an das Membranglykoprotein
ein Nachweis der Existenz, der Lokalisierung und/oder der Menge
des Antigens führbar ist.
- 20
- 25 20. Antisense-Vektor, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Teil der
Aminosäuresequenz des Vektors der in SEQ NO ID:1 angegeben
Sequenz entspricht.

21. Antisense-Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass ein Teil der Nucleotidsequenz des Vektors der in SEQ NO ID:2 angegeben Sequenz entspricht.



Figur 1

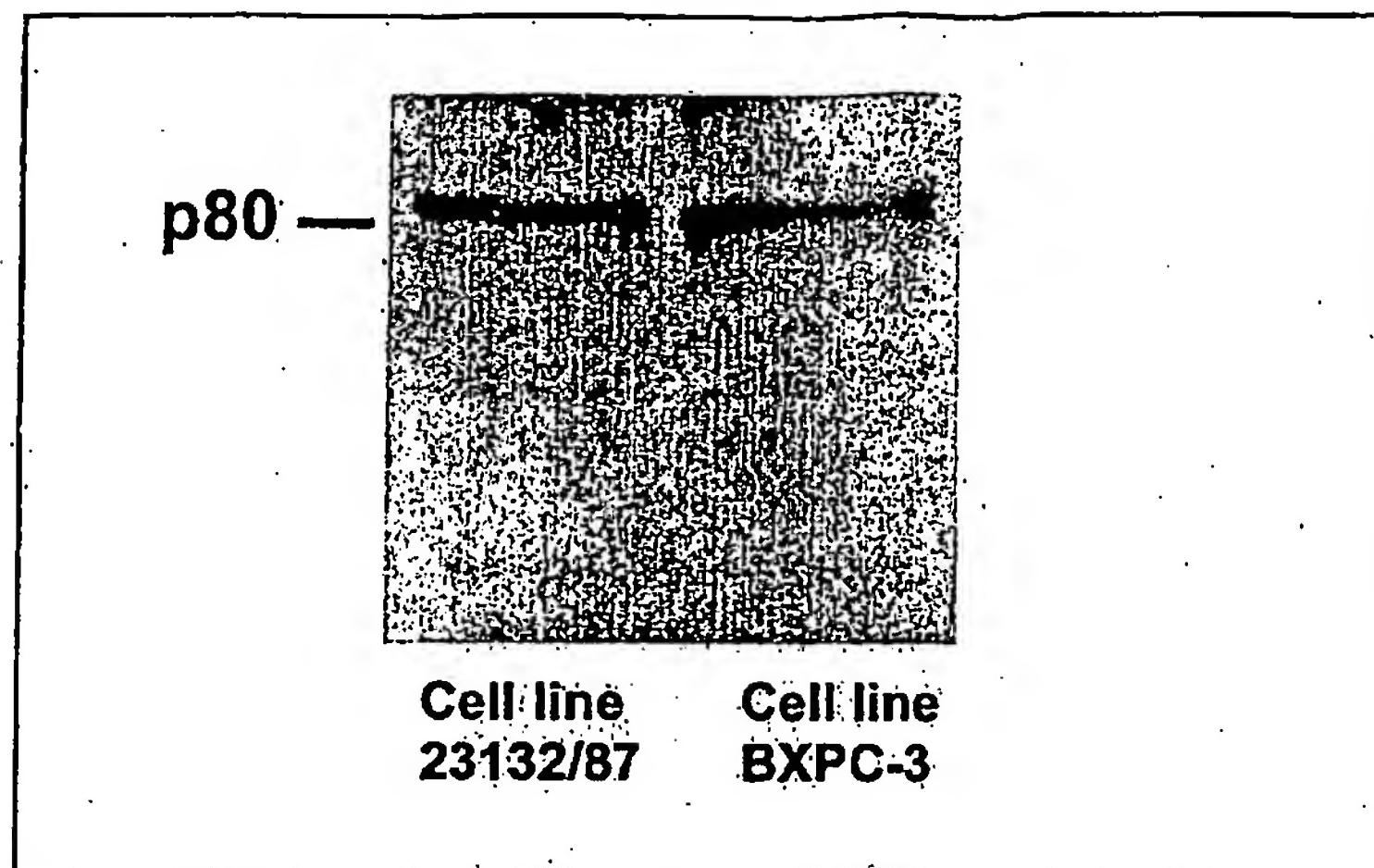


A: BXPC-3 Zellen untransfiziert

B: BXPC-3 Zellen transfiziert mit Vektor

C: BXPC-3 Zellen transfiziert mit antisense-Vektor

Figur 2



Figur 3

**Bestimmung potentieller Glykosylierungsstellen der partiellen Sequence des
humanen alpha -integrin binding protein p80**

Bestimmt durch eine Suche in der Datenbank des „UK MRC Human Genome Mapping Projects“, <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/prot-anal.html>

GKADIPDSSL WENPDSAQAN GIDSVLSRAE IASCSYEARQ LGIKNGMFFG	50
HAKQLCPNLQ AVPYDFHAYK EVAQTLTLYETL ASYTHNIEAV SCDEALVDIT	100
EILAETKLTP DEFANAVRME IKDQTKCAAS VGIGSNILLA RMATRKAKPD	150
GQYHLKPEEV DDFIRGQLVT NLPGVGHSME SKLASLGIKT CGDLQYMTMA	200
KLQKEFGPKT QMLYRFCRG LDDRPVRTEK ERKSVS A EIN YGIRFTQPKE	250
AEAFLLLSLE EIQRRLAETG MKGKRLTLKI MVRKPGAPVE TAKFGGHGIC	300
DNIARTVTLD QATDNAKIIG KAMLNMFHTM KLNISDMRGV GIHVNLVPT	350
NLNPESTCPSR PSVQSSHFPS GSYSVRDVFQ VQKAKKSTEE EHKEVFRAAV	400
DLEIASSAERT CTFLPPFPAA LPTSPDTNKA ESSGKWNLH TPVSVQSRLN	450
<u>L</u> SIEVPSPSQ LDQSVLEALP PDLREQVEQV CAVQQAESHG DKKKEPVNGC	500
NTGILPQPVG TVLLQIPEPQ ESNSDAGINL IALPAFSQVD PEVFAALPAE	550
LQRELKAAYD QRQRQGENST HQQSASASVP KNPLLHLKAA VKEKKRNKKK	600
KTIGSPKRIQ SPLNNKLLNS PAKTLPGACG SPQKLIDGFL KHEGPPAEKP	650
LEELSASTSG VPGLSSLQSD PAGCVRPPAP NLAGAVEFND VKTLLREWIT	700
TISDPMEEDI LQVVKYCTDL IEEKDLEKLD LVIKYMKRLM QQSVESVWNM	750
AFDFILDNVQ VVLQQTYGST LKVT	774

Es kann anhand der Aminosäuresequenz vorhergesagt werden, daß das Molekül p80 4 potentielle N-Glykosilierungsstellen besitzt

Diese Stellen sind an den folgenden Aminosäurepositionen:

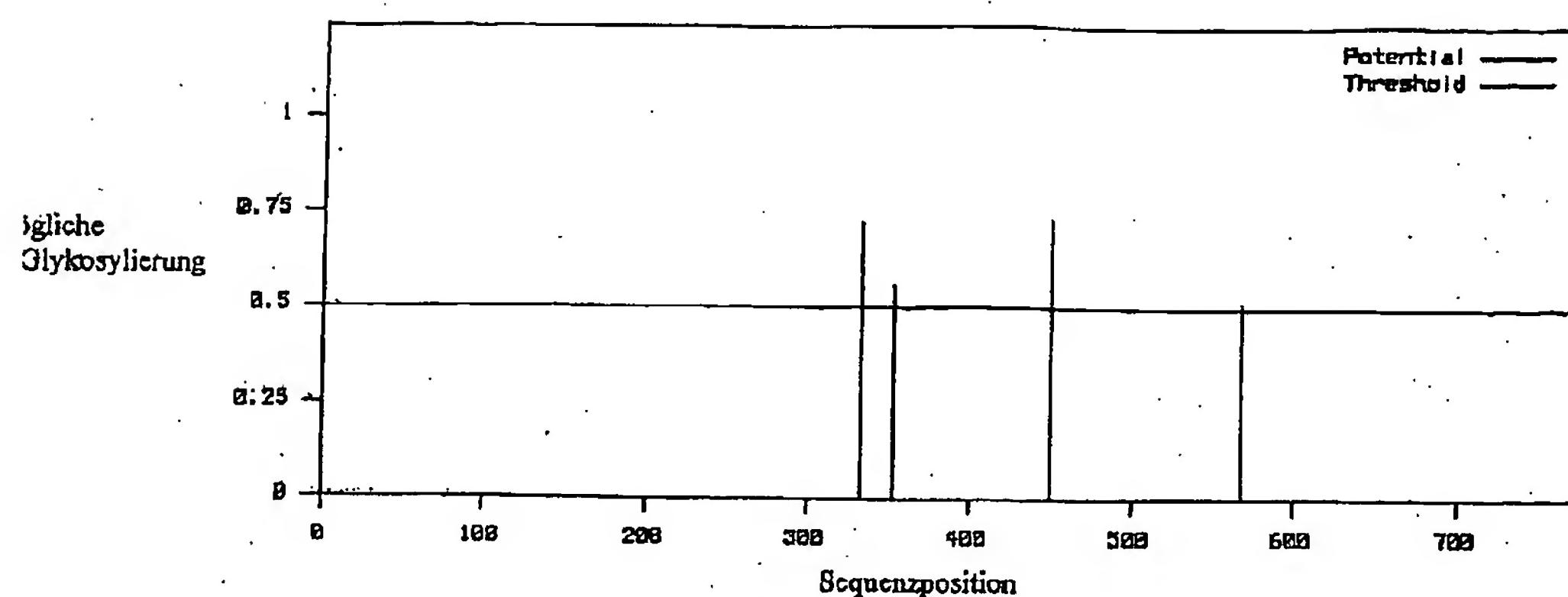
(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury	NGlyc agreement	result
Sequence	333	0.7279	(9/9)	++	
Sequence	353	0.5604	(5/9)	+	WARNING: PRO-X1.
Sequence	450	0.7334	(9/9)	++	
Sequence	568	0.5163	(4/9)	+	

Die Analyse zeigt, dass die wahrscheinlichsten Glykosylierungsstellen an den Positionen Nummer 333, 353, 450 sind

Figur 4a

Mögliche N-Glykosilierungsstelle in der Sequenz



Figur 4b

Bestimmung potentieller N-Glykosylierungsstellen des humanen REV-1 Proteins

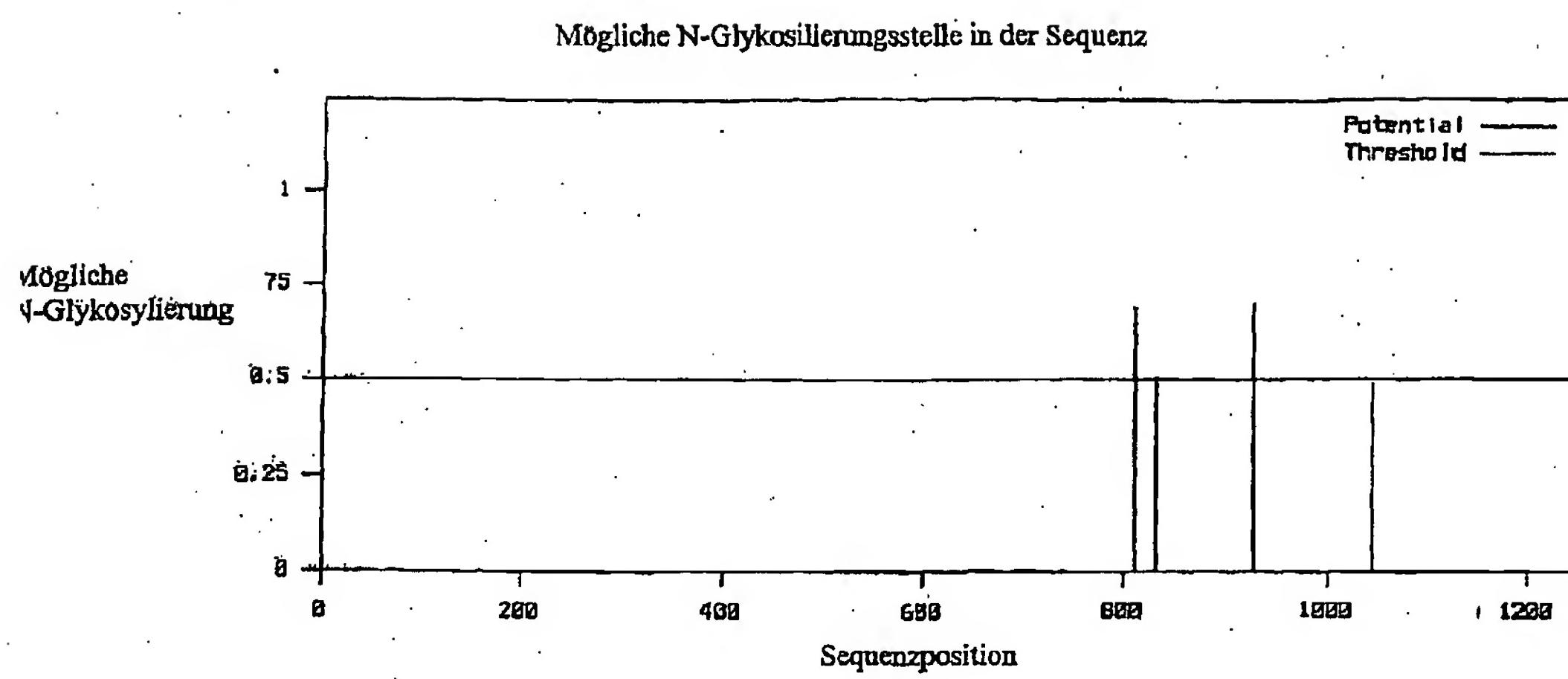
Bestimmt durch eine Suche in der Datenbank des „UK MRC Human Genome Mapping Projects“, <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/prot-anal.html>

Name:	Sequence	Length:	1251		
MRRGGWRKRA	ENDGWETWGG	YMAAKVQKLE	EQFRSDAAMQ	KDGTSSTIFS	50
GVAIYVNGYT	DPSAEELRKL	MMLHGGQYHV	YYRSRKTTHI	IATNLPNAKI	100
KELKGEKVIR	PEWIVESIKA	GRLLSYIPIYQ	LYTKQSSVQK	GLSFNPVCRP	150
EDPLPGPSNI	AKQLNNRVNH	IVKTIETENE	VKVNGMNSWN	EEDENNDFSF	200
VDLEQTSPGR	KONGIPHPRG	STAIFNGHTP	SSNGALKTQD	CLVPMVNSVA	250
SRLSPAQSQE	EDKAEKSSD	FRDCTLQQLQ	QSTRNTDALR	NPHRTNSFSL	300
SPLHSNTKIN	GAHHSTVQGP	SSTKSTSSVS	TFSKAAPSVP	SKPSDCNFIS	350
NFYSHSRLHH	ISMWKCELTE	FVNLTQRQSN	GIFPGREKLK	KMKTGRSALV	400
VTDTGDMSDL	NSPRHQSCIM	HVDMDCFVVS	VGIRNRPDLK	GKPVAVTSNR	450
GTGRAPILRPG	ANPQLEWQYY	QNKLKGKAA	DIPDSSLWEN	PDSAQANGID	500
SVLSRAEIAS	CSEYEARQLGI	KNGMFFGHAK	QLCPNLQAVP	YDFHAYKEVA	550
QTLYETLASY	THNIEAVSCD	EALVDITEIL	AETKLTPDEF	ANAVRMEIKD	600
QTKCAASVGI	GSNILLARMA	TRKAKPDGQY	HLKPEEVDDF	IRGQLVTNLP	650
GVGHSMESKL	ASLGIKTCGD	LQYMTMAKLQ	KEFGPKTGQM	LYRFCRGLDD	700
RPV RTEKERK	SVSAEINYGI	RFTQPKEAEA	FLLSLSEEIQ	RRLEATGMKG	750
KRLTLKIMVR	KPGAPVETAK	FGGHGICDNI	ARTVTLDQAT	DNAKIIGKAM	800
LNMFHTMKLN	<u>ISDMRGVGIIH</u>	<u>VNQLVPTNLN</u>	<u>PSTCPSRPSV</u>	<u>QSSHFPSSGY</u>	850
SVRDVFQVQK	AKKSTEEEHK	EVFRAAVDLE	ISSASRTCTF	LPPFP AHLPT	900
SPDTNKAESS	GKWNGLHTPV	SVQSRLNLSI	EVPSPSQLDQ	SVLEALPPDL	950
REQVEQVCAV	QQAESHGDKK	KEPVNGCNTG	ILPQPVGTVL	LQIPEPQESN	1000
SDAGINLIAL	PAFSQVDPEV	FAALPAELQR	ELKAAYDQRQ	RQGENSTHQQ	1050
SASASVPKNP	LLHLKAAVKE	KKRNKKKKTI	GSPKRIQSPL	NNKLLNSPAK	1100
TLPGACGSPQ	KLIDGFLKHE	GPPAEKPLEE	LSASTSGVPG	LSSLQSDPAG	1150
CVRPPAPNLA	GAVEFNDVKT	LLREWITTIS	DPMEEIDLQV	VKYCTDLIEE	1200
KDLEKLDLVI	KYMKR LMQQS	VESVWNMAFD	FILDNVQVVL	QQTYGSTLKV	1250
T					

(Threshold=0.5)

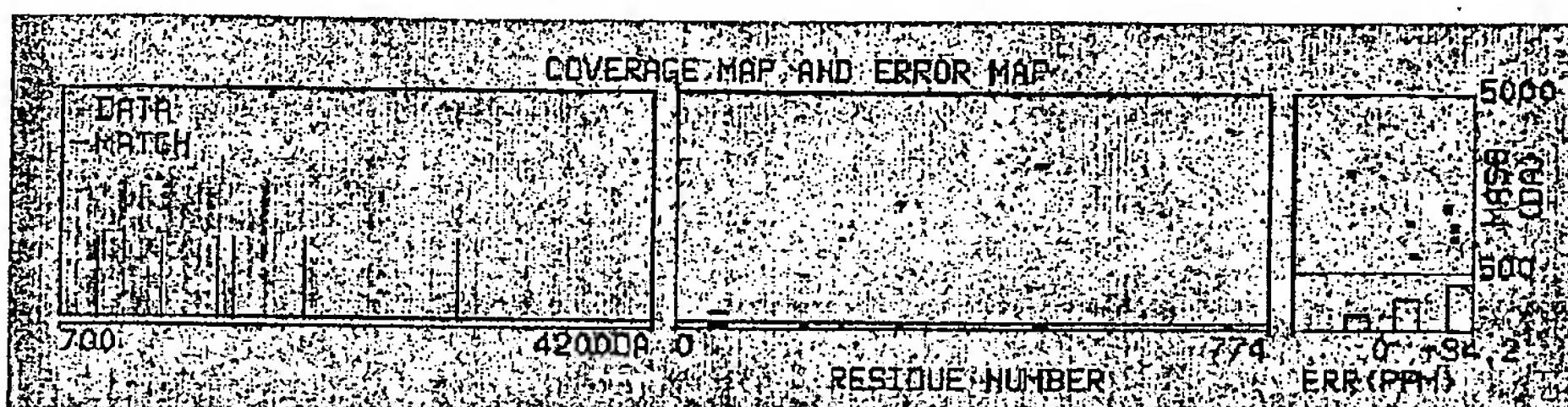
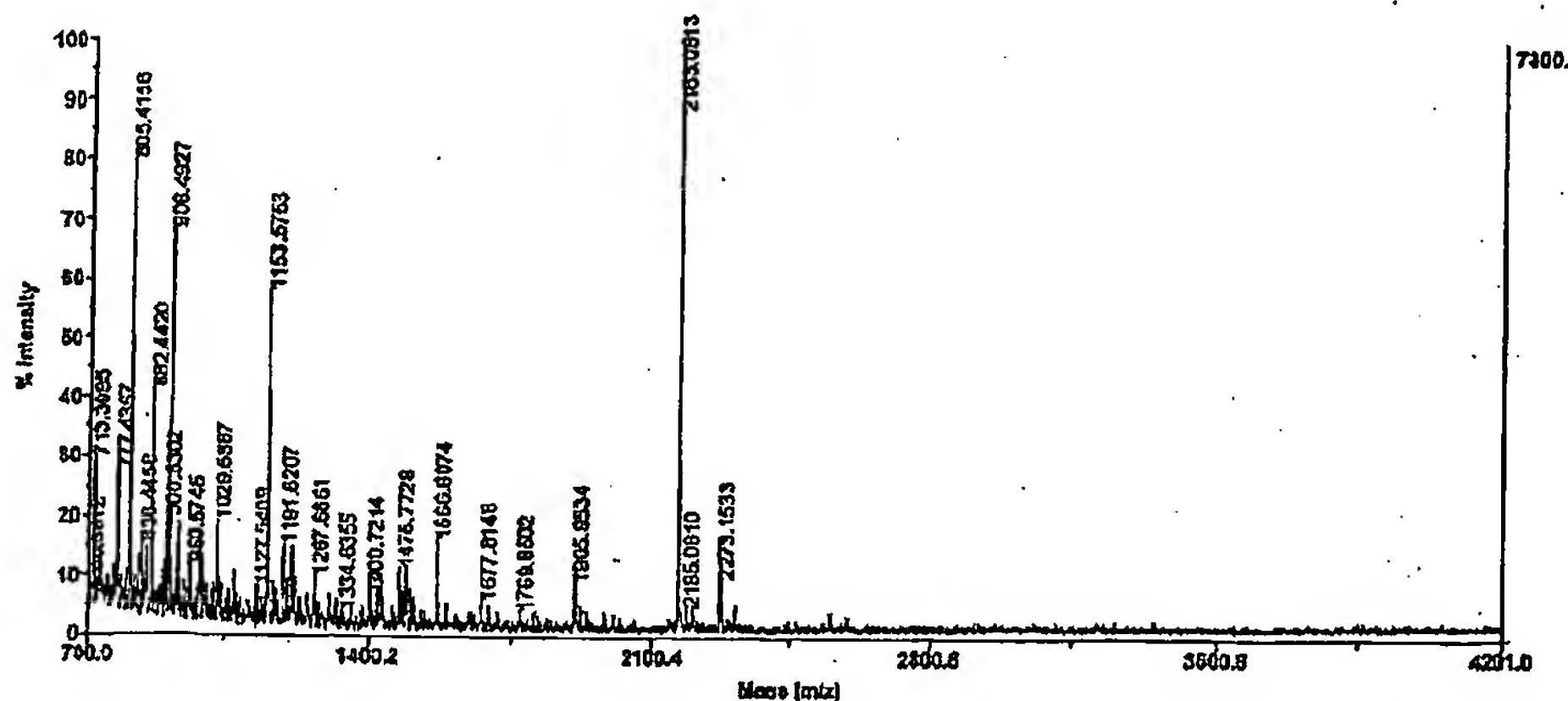
SeqName	Position	Potential	Jury	NGlyc agreement result
Sequence	810	NISD	0.6898	(9/9) ++
Sequence	830	NPST	0.5101	(4/9) + WARNING: PRO-X1.
Sequence	927	NLSI	0.7031	(9/9) ++
Sequence	1045	NSTH	0.4883	(6/9) -

Figur 5a



Figur 5b

MALDI-Analyse des PM-2 Antigens



	Measured Mass (m/z)	Avg/Computed Mass	Error (ppm)	<input type="checkbox"/> Residues	<input type="checkbox"/> Start	<input type="checkbox"/> To	<input type="checkbox"/> Cut	Missed Peptide sequence
Nr. 1	926.505	N 926.493	13	220	227	0		GIDDERPVRA
Nr. 2	1315.646	M 1315.609	28	294	305	0		FGGGHGICCONIBR
Nr. 3	1654.022	M 1654.775	28	716	728	1		YCTDOLIEEKILEK
Nr. 4	1752.901	M 1752.882	11	166	182	0		CQLVTNLPGVGHSMESK
Nr. 5	2169.065	M 2169.011	25	475	493	1		EQVEQVCRVCQAESHHGIVKK
Nr. 6	3052.411	M 3052.446	-12	45	70	1		NGAFFGHRQLCPNLQAWPYDFHAYK

Nr. 1 = Keine Homologie gefunden

Nr. 2 = Homolog zum alpha-integrin binding protein p80

Nr. 3 = Homolog zum alpha-integrin binding protein p80

Nr. 4 = Homolog zum alpha-integrin binding protein p80

Nr. 5 = Keine Homologie gefunden

Nr. 6 = Homolog zum alpha-integrin binding protein p80

Figur 6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.